

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平8-511764

(43)公表日 平成8年(1996)12月10日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 31/725	A B E	8314-4 C	A 6 1 K 31/725
C 0 8 B 37/10		7433-4 C	C 0 8 B 37/10

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 27 頁)

(21)出願番号 特願平6-504708
(86) (22)出願日 平成5年(1993)7月23日
(85)翻訳文提出日 平成7年(1995)1月24日
(86)国際出願番号 P C T / U S 9 3 / 0 6 9 3 3
(87)国際公開番号 W O 9 4 / 0 2 1 0 7
(87)国際公開日 平成6年(1994)2月3日
(81)指定国 E P (A T , B E , C H , D E ,
D K , E S , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M
C , N L , P T , S E) , A U , B R , C A , J P , K
R

(71)出願人 ケネディ, トーマス・ビー
アメリカ合衆国、バージニア 23294、リ
ッチモンド、パーラム・ロード 7702 マ
クガイア・クリニック
(72)発明者 ケネディ, トーマス・ビー
アメリカ合衆国、バージニア 23294、リ
ッチモンド、パーラム・ロード 7702 マ
クガイア・クリニック
(74)代理人 弁理士 山本 秀策

(54)【発明の名称】 好中球エラスターゼ及びカテプシンGの阻害方法及び阻害薬

(57)【要約】

哺乳類における好中球エラスターゼ及びカテプシンGを阻害する方法及び薬剤であって、治療有効量の脱2-O-硫酸化ヘパリンをそれを必要としている哺乳類に投与することからなる方法及び薬剤である。本薬剤は好ましくはエーロゾル投与又は静脈内 (I V) 注射により投与される。本発明の詳細な実施態様においては、エラスターゼに対する脱2-O-硫酸化ヘパリン比は、約0.2以上及び約2.0未満であり、カテプシンGに対する脱2-O-硫酸化ヘパリン比は約0.4以上及び約2.0未満である。脱2-O-硫酸化ヘパリン薬剤は好ましくは、生理学的に緩衝された食塩水、正常食塩水及び蒸留水からなる群より選ばれてもよい生理学的に許容される担体を含む。

【特許請求の範囲】

1. 哺乳類における好中球エラスターゼ及びカテプシンG阻害のための薬剤であって、ヘパリンの α -L-イズロン酸-2-スルフェート糖単位の2-O-硫酸基をアルカリ加水分解により除去することによって調製される、治療有効量の非抗凝固性脱硫酸化ヘパリンからなる薬剤。
2. 該薬物がエーロゾル投与により投与される請求の範囲第1項記載の薬剤。
3. 該薬物が静脈内（I V）注射により投与される請求の範囲第1項記載の薬剤。
4. エラスターゼに対する脱2-O-硫酸化ヘパリン比が約0.2以上及び約2.0未満である請求の範囲第1項記載の薬剤。
5. カテプシンGに対する脱2-O-硫酸化ヘパリン比が約0.4以上及び約2.0未満である請求の範囲第1項記載の薬剤。
6. 生理学的に許容される担体を含む請求の範囲第1項記載の薬剤。
7. 該担体が、生理学的に緩衝された食塩水、正常食塩水及び蒸留水からなる群より選ばれる請求の範囲第6項記載の薬剤。
8. 哺乳類における好中球エラスターゼ及びカテプシンGを阻害する方法であって、請求の範囲第1項記載の治療有効量の脱2-O-硫酸化ヘパリンを哺乳類に投与することからなる方法。
9. 該治療有効量がエーロゾル投与により投与される請求の範囲第8項記載の方法。
10. 該治療有効量が静脈内（I V）注射により投与される請求の範囲第8項記載の方法。
11. エラスターゼに対する脱2-O-硫酸化ヘパリン比が約0.2以上及び約2.0未満である請求の範囲第8項記載の方法。
12. カテプシンGに対する脱2-O-硫酸化ヘパリン比が約0.4以上及び約2.0未満である請求の範囲第8項記載の方法。
13. 該脱2-O-硫酸化ヘパリンを生理学的に許容される担体と混合することを含む請求の範囲第8項記載の方法。

14. 該担体が、生理学的に緩衝された食塩水、正常食塩水及び蒸留水からなる群より選ばれる請求の範囲第13項記載の方法。

【発明の詳細な説明】**好中球エラスターゼ及びカテプシンGの阻害方法及び阻害薬**

本発明は哺乳類の医学的治療に関し、より詳細には哺乳類の好中球エラスターゼ及びカテプシンGをコントロールする方法及びコントロールするための薬物に関する。

活性化された好中球は、ヒト及びそのほかの哺乳類における多数の疾患において、罹患器官へ移動した後に多数の酸化性化学物質及び酵素を放出することによって、重要な役割を果たす。スーパーオキシドアニオン、過酸化水素及び次亜塩素酸などの酸化剤は、それ自体有害であるが、活性化された好中球によって産生される主な破壊性成分はカチオン性プロテアーゼであり、その大部分はエラスターゼ及びカテプシンGからなる。好中球がこれらのプロテアーゼを放出すると、プロテアーゼが、 $\alpha-1$ -抗プロテイナーゼなどの十分な細胞外抗プロテイナーゼによって中和されない限り、組織破壊が起きる。

遺伝による $\alpha-1$ -抗プロテイナーゼの欠損を有する人は、治療不可能なタンパク質分解性肺疾患を生涯にわたって有し、最終的には肺気腫を発症する。喫煙は、活性化された白血球の肺への流入と、その後の顆粒の分解とプロテアーゼの放出をもたらす。喫煙によって生じる酸化剤は又、活性部位の近くの重要なメチオニンを酸化することによって、 $\alpha-1$ -抗プロテイナーゼを不活性化する。喫煙により肺へ流入した結果、肺胞単位へ到達したエラスターゼは、 $\alpha-1$ -抗プロテイナーゼの活性を酸化的に不活性化するとともに、プロテアーゼ／抗プロテイナーゼ活性の不均衡を招き、これ

が喫煙によるヒトの肺気腫の主な原因であると考えられている。

気道内に不均衡が生じると、気道に慢性炎症が生じるので、好中球由来のエラスターゼ及びカテプシンGが、慢性気管支炎の病因として重要であると考えられている。肺脈管系内で不均衡が生じると、その結果生じる微小脈管系の傷害が、肺浮腫形成をもたらす。このようにして、活性化された白血球の流入並びにエラスターゼ及び他の好中球プロテアーゼの放出が、成人呼吸困難症候群における肺の傷害の主要原因となっている。好中球由来のエラスターゼは、嚢胞線維症、つ

まり高度に粘液膿性である気管支炎であって、ヒトにおけるどのような疾患におけるよりもエラスターゼ活性測定値が最大級のものであることを特徴とする疾患におけるタンパク質分解性肺破壊の主要原因でもある。

また、心筋梗塞及び心発作など、器官における血流量の突然の低下とその後の血流の回復によって起こされる疾患（虚血－再灌流性傷害）は、活性化された白血球がすでに傷害を受けている組織に速やかに侵入する際の再灌流期における組織破壊の拡大を特徴とする。虚血後に再灌流された器官に到達する好中球エラスターゼは、心筋、腸及びそのほかの組織の再灌流による傷害の病因において中枢的役割を果たしていることが証明されている。上記の過程におけるカテプシンGの役割は、詳しく検討されていないが、好中球中にはエラスターゼの2倍ものカテプシンGが存在しているため、カテプシンGも又同じく重要な役割を果たしていると考えられる。

エラスターゼ及びカテプシンGは、ヒトにおける様々な重大な疾患の仲介物質であるため、これらの酵素の有効な阻害物質を開発す

ることは、実験薬理学における実際的な目標である。しかし今日に至るまで、エラスターゼ及びカテプシンGの両方を有効かつ安全に阻害する物質は存在していない。エラスターゼの有機的阻害物質はわずかに開発されている（C.P. Sommerhoff, et al., European Journal of Pharmacology (1991) 193 : 153-158）が、この物質はカテプシンGに対して活性を有することは証明されていない。2種類の生体分子、 α -1-抗プロテイナーゼ阻害剤及び気管支分泌阻害剤は、好中球の酸化剤による不活性化を受けるため、好中球酸化剤とプロテアーゼとが同時に存在する生物学的環境においては、有効ではないと考えられる（D.C. Flenley, Quarterly Journal of Medicine (1986) 61 : 901-909 ; C. Vogelmeier, et al., Journal of Clinical Investigation (1991) 87 : 482-488）。エラスターゼ及びカテプシンGの両方に対しては同時に有効であり、タンパク質分解又は酸化による不活性化に対しては感受性を示さない阻害物質が求められている。硫酸化多糖類は、これらの望ましい特性のいずれをも有している。

ヘパリン及びそのほかの硫酸化多糖類が、ヒト多形核白血球由来のエラスター

ゼ及びカテプシンGの強力な非競合性阻害物質であることは、以前より報告されている (N.V. Rao, et al., A.M. Rev. Respir. Dis. (1990) 142:407-412; A. Baici, et al., Biochem. Pharmacol. (1980) 29:1723-1727; A. Baichi, et al., Biochem. Pharmacol. (1981) 30:703-708; K. Marossy, Biochim. Biophys. Acta, (1981) 659:351-361; A. Bacici, et al., Chem. Biol. Interactions (1984) 51:1-11; A. Lutini, et al.,

Biochem. Int. (1985) 10:221-232; F. Redini, et al., Biochem. J. (1988) 252:515-519; and F. Redini, et al., Biochem. Pharmacol. (1988) 37:4257-4261)。阻害の原理は、多糖類の負に荷電した硫酸基と、エラスターゼ又はカテプシンGなどの高度に塩基性である酵素の表面に位置するアルギニン残基の正に荷電したグアニジニウム基との間の静電結合の形成である。この相互作用は、酵素の活性中心に影響を及ぼさないが、エラスチン分解活性を間接的に失わせる。

あらゆる硫酸化多糖類のうち、ヘパリンが、ヒトにおいて最も長く最も安全に使用されてきた歴史を有している。毒物学的見地からは、エアゾールによって肺に選択的に到達するとしても、ヘパリンが抗凝固剤であるとの事実はあるが、それでもヘパリンは、エラスターゼ及びカテプシンGの最も望ましい阻害物質である。多糖類の繰り返し配列が、血漿タンパク質であるアンチトロンビンIIIと特異的に結合し、血液凝固のカスケードに対するトロンビンのプロコアグラント効果をアンチトロンビンが阻害する速度を劇的に加速するので、ヘパリンが抗凝固剤として作用すると考えられている。市販のヘパリンのうちごく一部がアンチトロンビンIIIと結合するので、アンチトロンビンIII-セファロースのアフィニティカラムにヘパリンを通過させることによって、抗凝固性分画が除去され、抗凝固活性の無い不完全に硫酸化された分画が残る。しかし、この方法を用いてヘパリンからその抗凝固活性を除去するのは、市販を目的とした実際的な規模で行うにはあまりに非効率的である。

従来の技術においては、ヒト多形核白血球エラスターゼ

(HLE) 及びカテプシンGの阻害物質としての多糖類の活性は、修飾されていない硫酸基の存在に直接依存している。硫酸デキストランは、強力なエラスターゼ阻害物質であるが、硫酸化されていないデキストランはそうではない。さらに又、入手可能な文献においては、多糖類を部分的に脱硫酸化することによっても、HLE 及びカテプシンGに対する阻害活性が失われるが、化学的に過剰に硫酸化すると、阻害活性が増強されることが示唆されている。HNO₂により化学的に解重合し、ゲルろ過することによって得られるヘパリンの分画を用い、硫酸基の重要性に関する研究が行われている(F. Redini, et al., Biochem. J., (1988) 252: 515-519)。この後半の工程によって得られる非修飾ヘパリン分画は、強力なエラスターゼ阻害物質であったが、その強力な抗凝固力も保持していた。分画を化学的にO-硫酸化することによって硫酸化の程度を増大させると、エラスターゼ阻害物質としての力価も著しく上昇したが、分画の抗凝固活性はあまり変動しなかった。一方、脱N-硫酸化し、さらにN-アセチル化(残存している正荷電を保護し、分画の抗凝固活性を低下させる)することにより、ヒト白血球エラスターゼ及びカテプシンGに対する阻害活性は完全に除去された。脱N-硫酸化分画を化学的に過剰にO-硫酸化すると、阻害活性が回復したばかりでなく、硫酸化は同程度であるが、N-硫酸基を有する本来の物質に比べて、より大きな阻害力価を有する分画が得られた。阻害活性にとって重要なのは、硫酸化の程度だけではなく、N-硫酸基の存在よりも、O-硫酸基の存在のほうがより重要であることが示唆されている。しかし、これらの高度に有効な修飾ヘパ

リンは、強力な抗凝固活性を保持しているため、哺乳類での使用に適したものはなかった。

抗凝固剤としてのヘパリンを不活性化するための幾つかの化学的方法がある。硫酸化の程度が、抗凝固活性の重要な決定因子であることが確立されているため、化学的方法の多くは、化学的脱硫酸化の方法に基づいている。

ピリジニウムヘパリン塩をジメチルスルホキシド(DMSO)の5%メタノール溶液により50℃で1.5時間処理することによってN-脱硫酸化し、DMSOの10%メタノール溶液により100℃で18時間同様に処理することによっ

て全体的に脱硫酸化する方法が、ヘパリンから抗凝固活性を除去するために通常用いられている修飾法である。ヘパリンから抗凝固活性を除去するための別の方法は、55～60℃で72時間酸による加水分解を行い、部分的に脱N-硫酸化する方法である。しかし、すべての硫酸基を除去するか、又はN-硫酸基の除去により部分的に脱硫酸化を行うと、ヘパリン及びほかの硫酸化多糖類は、ヒトエラスターゼ及びカテプシンGの阻害物質としては非活性化されてしまう。従って、現在用いられているヘパリンの抗凝固活性を除去するための脱硫酸化法によって、エラスターゼ及びカテプシンGなどのカチオン性白血球プロテアーゼの阻害能も又破壊されてしまうことを、従来の技術は教示している。

従って、過剰な硫酸化により、抗凝固活性が保持されると共に、エラスターゼ及びカテプシンGに対する活性も増大する一方、脱硫酸化により、抗凝固活性が低下すると共に、エラスターゼ及びカテ

プシンGに対する活性も大きく減少することが従来の技術により証明されている。従来の技術からの予想に反し、本発明者は、 α -L-イズロン酸-2-スルフェートを選択的に脱2-O-硫酸化することによって、修飾ヘパリンのエラスターゼ及びカテプシンG阻害物質としての活性が失なわれることなく、ヘパリンの抗凝固活性が除去されることを発見した。

本発明の目的は、哺乳類におけるエラスターゼ及びカテプシンGを阻害する方法を提供することである。

本発明の別の目的は、抗凝固活性を実質的に誘導しない治療薬にこのような阻害作用を導入することである。

本発明のさらに別の目的は、本治療薬のエーロゾル又は静脈内（IV）投与により、エラスターゼ及びカテプシンGを阻害する方法を提供することである。

本方法により、抗凝固活性を誘導せずにエラスターゼ及びカテプシンGを実質的に阻害する治療薬が提供されることは、本発明の利点である。

本治療薬が、毒物学的に特性付けられた化合物から得られることは、本発明の別の利点である。

以下の図及び実施例を含む明細書を考慮することによって、当業界における技

術者であれば、本発明の付加的目的及び利点を知ることができるであろう。

本発明は、哺乳類における好中球エラスターゼ及びカテプシンG阻害のための薬剤であって、ヘパリンの α -L-イズロン酸-2-スルフェート糖単位の2-O-硫酸基を除去することに

よって調製される、治療有効量の脱硫酸化ヘパリンからなる薬剤を提供するものである。本発明の好ましい実施態様においては、本薬剤はエーロゾル又は静脈内（IV）注射によって投与される。本発明のほかの実施態様においては、エラスターゼに対する脱2-O-硫酸化ヘパリンの有効比率は、約0.2以上及び約2.0未満であるよう選択され、又はカテプシンGに対する脱2-O-硫酸化ヘパリンの有効比率は、約0.4以上及び約2.0未満であるよう選択される。本薬物は好ましくは、生理学的に緩衝された食塩水、正常食塩水及び蒸留水からなる群より選ばれてもよい生理学的に許容される担体を含む。

本発明はまた、哺乳類における好中球エラスターゼ及びカテプシンGを阻害する方法であって、治療有効量の脱2-O-硫酸化ヘパリンを哺乳類に投与することからなる方法を提供する。本発明の方法の好ましい実施態様においては、治療有効量を、エーロゾル又は静脈内（IV）注射によって投与する。本発明の別の実施態様においては、エラスターゼに対する脱2-O-硫酸化ヘパリンの有効比は、約0.2以上及び約2.0未満であり、又はカテプシンGに対する脱2-O-硫酸化ヘパリンの有効比率は、約0.4以上及び約2.0未満である。本薬物は好ましくは、生理学的に緩衝された食塩水、正常食塩水及び蒸留水からなる群より選ばれてもよい生理学的に許容される担体を含む。

以下に述べる詳細な説明を図面と共に参照することにより、本発明がよりわかりやすく説明されよう。

図1は、ヘパリンの5糖体結合配列における脱2-O-硫酸化 α

-L-イズロン酸の化学式を示し；

図2は、ヘパリンの5糖体結合配列における α -L-イズロン酸の2-O-位を脱硫酸化するための予想反応式を示し；

図3は、食塩水（コントロール）、ヒト白血球エラスターゼ（HLE）、HLE プラスヘパリン、及びHLE プラス脱硫酸化ヘパリンの投与24時間後の気管支肺胞洗浄液中の多形核白血球（PMN）細胞の数のグラフを示し；

図4は、食塩水（コントロール）、HLE、HLE プラスヘパリン、及びHLE プラス脱硫酸化ヘパリンの投与24時間後の気管支肺胞洗浄液中のヘモグロビン含有量の測定値のグラフを示し；そして

図5は、食塩水（コントロール）、HLE、HLE プラスヘパリン、及びHLE プラス脱硫酸化ヘパリンの投与24時間後の気管支肺胞洗浄液中のタンパク質濃度のグラフを示す。

図1に示す、ヘパリンの5糖体結合配列における α -L-イズロン酸からの2-O-硫酸基の除去は、初めてE.G.V. Percival, Quarterly Rev., (1949) 3:369-384により解明され、J.P.R. Turvey, Adv. Carbohydrate Chem., (1965), 20:183-218においてまとめられたようなアルカリ条件下における硫酸化炭水化物の化学反応によって起きる。2級ヒドロキシル基上の硫酸基は、硫酸基が除去される際のエポキシド中間体の形成に利用可能な、隣接したトランス位に遊離ヒドロキシル基があれば、アルカリによる加水分解を受ける。これは、図2に示されている。ヘパリンに関しては、この反応が、凍結乾燥の間にアルカリによる加水分解とともに起

ることが、最近報告されている。（R. Rej, et al., Throm. Haemostas. (1989) 61:540; and M. Jaseja, et al., Can. J. Chem. (1989) 67:1449-1456.）本発明によるこれらの操作の修正により、エラスターゼ及びカテプシンGには有効であるが、非処理ヘパリンが有する抗凝固特性を有さないヘパリンが得られた。

本発明に関しさらに理解を得るために、以下の実施例には、ある種のより詳細な説明を示した。

実施例 I

ヘパリンの部分的脱N-硫酸化

4%ブタ腸粘膜ヘパリン（Scientific Protein Laboratories, Waunakee, WI

）水溶液をカチオン交換樹脂カラム、Dowex 50W x 8X (H^+) に通過させることによって、ブタ腸粘膜ヘパリンをヘパリン酸に変換した。L. Levy et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1962) 109:901-905及びE. Sache et al., Thromb. Res. (1989) 55:247-258によって報告されているように、ヘパリン酸溶液を標準的な化学的灌流装置に55℃で72時間保持し、約70%のN-硫酸塩を除去した。本溶液をIR-400樹脂(OH^-)に通過させて過剰の SO_4^{2-} を除去し、pHを7.0に調製し、凍結乾燥することによって、脱N-硫酸化されたヘパリンを回収した。

実施例II

部分的脱N-硫酸化ヘパリンのHLEとの相互作用

一定量のHLE (100 pmol) を、実施例Iで得られた部分的脱N-硫酸化ヘパリンと共に、ヘパリン量を増大させながら (10~50 pmol、I:E比率は0.1~0.5)、HEPES緩衝液

(0.125 M、0.125%トリトン-X-100、pH7.5) 500 μ l 中、最終容量が900 μ lになるよう希釈し、25℃で30分間保温することによって、部分的脱N-硫酸化ヘパリンによるHLEの阻害を測定した。3 mM N-Suc-Ala-Ala-Val-NA (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, ジメチルスルホキシド [DMSO] 中で調製) 100 μ lを加え、タンパク質分解により放出される色原体である4-ニトロアニリンの吸光度を405 nmで測定することによって、残存している酵素の活性を測定した。阻害%は、阻害物質がない場合の酵素活性に基づいて算出した。

部分的脱N-硫酸化ヘパリン及びヘパリンとHLEとの相互作用の結果を、表Iに示す。

表 I

H L E 阻害パーセント

基 質	H	NDH
阻害剤 ^a		
<u>I:E 比</u>		
0.1:1	53	29
0.2:1	79	37
0.3:1	88	37
0.4:1	90	49
0.5:1	91	50

^aH = ヘパリン ; N D H = 実施例 I により得られた部分的脱 N - 硫酸化ヘパリン。

表 I に示すように、ヘパリンは I : E 比 0.2 以上の場合にヒト

白血球エラスターゼ (H L E) を有意に阻害した。反対に、実施例 I で得られた部分的脱 N - 硫酸化ヘパリンにおいては、I : E 比 0.5 においてさえも、H L E の阻害能は大きく低下していた。従って、H L E の阻害剤としてのヘパリンの活性は、ヘパリンの抗凝固作用を除去するために通常用いられている本処理法による多糖類の部分的脱硫酸化によって、かなり低下した。これらの結果は、脱硫酸化により H L E 及びカテプシン G の阻害剤としてのヘパリンの活性が破壊されることを示唆した前述の従来技術における記載と一致していた。

実施例 III

ヘパリンの脱 2 - O - 硫酸化

0.4% ブタ腸粘膜ヘパリン (Scientific Protein Laboratories, Waunakee, WI) 水溶液 (4mg/ml) を 0.1N NaOH により pH 13.0 に調整し、40ml ずつ小分けして、凍結し、凍結乾燥した。生成物を水に再溶解し、アンバーライト I R - 120 プラス (H⁺) カチオン交換樹脂に通過させて過剰の水酸化ナトリウムを除去し、最終 pH を 7.0 に調整し、溶液を真空ろ過により 0.2 ミクロンのミリポアろ紙に通過させて、最終的な再凍結乾燥の前に無菌とした。

より大量の脱2-O-硫酸化ヘパリンを市販用に調製するには、ブタ腸粘膜ヘパリン (Scientific Protein Laboratories, Waunakee, WI) のナトリウム塩水溶液 (最高で5重量/体積%) にNaOHを加えてpH13.0に調製し、凍結乾燥を行う。過剰のNaOHを除去するために乾燥生成物を水溶液に再溶解し、3倍量

の冷エタノール (4℃) を加えてヘパリンを沈殿させる。混合物を4℃で12時間貯蔵し、沈殿物を完全に生成させてから遠心分離を行う。乾燥させて過剰のエタノールを蒸発させ、ヘパリン沈殿物をpH7.0の水溶液に再溶解させて、0.2ミクロンのミリポアろ紙によりろ過し、再び凍結乾燥する。

実施例IV

血液凝固に対する脱2-O-硫酸化ヘパリンの効果

実施例IIIにより得られた脱硫酸化ヘパリンの抗凝固能を、活性化された部分トロンボプラスチン時間 (APPT) に対する効果をin vitroにおいて測定することによって検討した。患者におけるヘパリンの抗凝固作用を臨床的に監視するのに用いられる通常の方法で、試験を行った。試験には、0.1及び1.0 mg/mlのヘパリン又は実施例IIIで得られた脱2-O-硫酸化ヘパリンをヒトの試験血清にin vitroで加えたものを用いた。

表II

	<u>コントロール</u>	<u>ヘパリン</u>		<u>脱2-O-硫酸化 ヘパリン</u>	
濃度 (mg/ml)	0	1.0	0.1	1.0	0.1
血餅形成までの時間 (秒)	35-45	>150	80	42	38

実施例IIIにより得られた脱2-O-硫酸化ヘパリンについては、ヘパリン及び実施例IIIにより得られた脱硫酸化ヘパリンの0.1 mg/ml血漿希釈液が、ラッセルクサリヘビ蛇毒により処理を行った血漿を利用したXa活性測定法における試験時間を延長し、Xa因子を阻害した。

表III

希 釈	抗 X a 因 子 活 性		
	コントロール血漿	ヘパリン	脱2-O-硫酸化 ヘパリン
1: 2		> 8分	42秒
1: 10		> 7分	33秒
1: 100		42秒	32秒
1:1000	35秒	32秒	32秒
0			

ヘパリンとは反対に、実施例IIIにより得られた脱硫酸化ヘパリンは、A P T T延長能をほとんど示さず、抗X a因子活性もほとんど示さなかった。

従って、脱2-O-硫酸化ヘパリンは、非硫酸化ヘパリンと比較すると、はるかに低下した抗凝固活性を示した。

実施例V

脱2-O-硫酸化ヘパリンのH L E及びカテプシンGとの相互作用

一定量のH L E (100 pmol) を、実施例IIIで得られた脱2-O-硫酸化ヘパリンと共に、ヘパリンの量を増大させながら(10~60 pmol、I/E比率は0.1~0.6)、H E P E S緩衝液(0.125 M、0.125%トリトン-X-100、pH7.5) 500 μ l中、最終容量が900 μ lになるよう希釈し、25℃で30分間保温することによって、脱2-O-硫酸化ヘパリンによるH L Eの阻害を測定した。3mM N-S u c-A l a-A l a-V a l-N A (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, ジメチルスルホ

キシド [DMSO] 中で調製) 100 μ lを加え、タンパク質分解により放出される色原体である4-ニトロアニリンの吸光度を405nmで測定することによって、残存している酵素の活性を測定した。阻害%は、阻害物質がない場合の酵素活性に基づいて算出した。

実施例IIIにより得られた脱2-O-硫酸化ヘパリンによるカテプシンGの阻

害は、基質が3mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (Sigma Chemical、DMSO中)であった以外は、上記と同様に測定した。

また、B.C. Starcher, Anal. Biochem. (1976) 74:441-447に基づき、ウシ靱帯エラスチンを調製した。エラスチン純度は、アミノ酸分析により測定した。その分解は、P.J. Stone, et al., Methods Enzymol. (1982) 82:588-605に記載の方法に従って、 $^3\text{H-NaBH}_4$ により標識したエラスチンを使用して測定した。トリチウム標識を行った粉末エラスチンをホモゲナイズし、使用直前のpHが7.4のリン酸緩衝食塩水(PBS)中で洗浄して、取り込まれなかった放射活性化合物を除去した。一定量のヒト白血球エラスターゼ(HLE)(67 pmol)を、脱2-O-硫酸化ヘパリン(6.7~134 pmol)と共に37℃で30分間、最終容量1.0mlのHEPES緩衝液(0.125 M、0.125%トリトン-X-100、pH7.5)中で予備培養した。各反応液900 μl ずつを ^3H -エラスチン5mg及び0.9%食塩水100 μl と共に37℃で培養した。溶解したペプチドを、中程度の多孔度を有するろ紙を用いてろ過し、エラスチン懸濁液から分離した。溶解した

3Hペプチドを定量することによって、分解速度を測定した。

脱2-O-硫酸化ヘパリン及びヘパリンのHLE及びカテプシンGとの相互作用の結果を、表IVに示す。

表IV

基 質 ^a	阻害パーセント				カテプシンG	
	HLE				C	
	A		B			
阻害剤 ^b	H	ODH	H	ODH	H	ODH
I:E比						
0.1:1	23	20	72	73	31	14
0.2:1	81	74	95	77	49	54
0.3:1	88	84	-	-	-	-
0.4:1	87	85	92	72	67	56
0.5:1	87	84	94	85	-	-
0.6:1	99	100	-	-	-	-
0.8:1	-	-	-	-	78	69
1.0:1	-	-	97	85	76	69
2.0:1	-	-	97	84	76	67

^aA = N - S u c - A l a - A l a - V a l - N A ; B = ³H - エラスチン ; C = S u c - A l a - A l a - P r o - P h e - p N A。

^bH = ヘパリン ; O D H = 実施例III により得られた脱2-O-硫酸化ヘパリン。

表IVに示したように、ヘパリン及び実施例IIIにより得られた脱2-O-硫酸化ヘパリンの両方によって、基質に対する阻害剤の比率（I：E）が0.2以上である場合、ヒト白血球エラスターゼ（HLE）が有意に阻害され、I：E比率が0.4以上である場合、カテプシンGもまた又有意に阻害される。この比率の範囲内ではいずれも、ヘパリン及び実施例IIIにより得られた脱2-O-硫酸化ヘパリンにより有効な阻害が認められるが、両者の間にはごくわずかな差しか認められない。したがって、脱2-O-硫酸化ヘパリンは、脱硫酸化されていない

ヘパリンとほぼ同一の阻害を示す。さらに脱2-O-硫酸化ヘパリンは、抗凝固活性をほとんど示さなかった。これは、非常に強力な抗凝固剤である非修飾ヘパリンとは反対である。実施例VI

In vivo (生体内試験) による検討

ヒト白血球エラスターゼ (HLE) により仲介される肺の障害に対する脱硫酸化ヘパリンの予防能を、体重90～110 gの雌性ゴールデンシリアンハムスター (Harlan Industries, Indianapolis, Indiana) を用いて調べた。フェノバルビタールにより麻酔を行ったハムスターの気管内に、無菌の0.9%食塩水 (NS) 0.25 ml、HLE (100 μ g) 含有NS 0.25 ml、又はヘパリン (Sigma) 若しくは実施例IIIにより得られた脱2-O-硫酸化ヘパリン500 μ gを含有するNS 0.25 ml及びその後HLE含有NS 0.25 mlを注射した。処理の24時間後に動物を放血により屠殺した。喉を開き、肺を全体的に切開した。気管にポリエチレン管を挿入し、NS 3 mlずつにより5回連

続して洗浄した。洗浄液を200 x Gで10分間遠心分離した。得られた細胞ペレットをハンクス平衡食塩溶液 (HBSS) 1 mlに再懸濁して細胞数の計測と同定を行った。上清については、急性障害の指標としてタンパク質とヘモグロビンの測定を行った。その結果を表Vに示す。

表 V

注射溶液 ^b	PMN ^a ($\times 10^6$ セル)	総ヘモグロビン (mg)	タンパク質 (mg/ml)
コントロール NS 0.5ml	0.95 (0.443)	0.396 (0.215)	35.08 (0.111)
HLE (100 μ g)	16.3 (0.744)	8.15 (0.53)	100.69 (0.98)
HLE+H (100 μ g+500 μ g)	10.83 (0.452)	0.867 (0.439)	41.06 (0.114)
HLE+ODH (100 μ g +500 μ g)	9.83 (0.86)	1.5 (0.23)	65.80 (0.659)

^a P M N = 多形核白血球

^b H L E = ヒト白血球エラスターゼ ; H = ヘパリン ; O D H = 実施

例IIIにより得られた脱2-O-硫酸化ヘパリン

ヘパリン及び実施例IIIにより得られた脱2-O-硫酸化ヘパリンは両方とも、in vivoにおいてエラスターゼにより誘発される障害の強力な阻害剤であった。

実施例IIIにより得られた脱2-O-硫酸化ヘパリンについて、毒性試験を行った。エラスターゼ及びカテプシンGの阻害剤であ

る、硫酸デキストランなどその他の硫酸化多糖類を、ラットに対し0.5mg/kgと低用量で気管支内に注射したところ、肺胞嚢に出血が起きた（肺胞出血）。実施例IIIにより得られた脱2-O-硫酸化ヘパリンを、ラットに10mg/kgもの用量で気管支内投与したところ、肺胞出血は起きなかった。

実施例IIIにより得られたアルカリ加水分解ヘパリンは、肺気腫、慢性気管支炎、成人呼吸困難症候群（ARDS）及び囊胞線維症などの呼吸器疾患の治療に、エアロゾルとして呼吸器系に直接投与することによって、使用することができる。無菌0.9%食塩水3mlに溶解した用量約10～約100mgの脱2-O-硫

酸化ヘパリンを、直径の中央値（メディアン）が 10μ 未満の粒子エアロゾルを発生させる陽圧源（圧縮機又は圧縮空気若しくは酸素のいずれか）に取り付けた通常臨床的に使用可能であるエアロゾル装置（デビルビス（Devilbiss）又はエイコン（Acorn）ネブライザー）を用いて約6時間ごとに（又は1日当たり約4回）肺内へエアロゾル投与する。

慢性気管支炎などの疾患には、更に低用量でも有効であろうが、呼吸器系分泌物中エラスターゼ濃度がはるかに高い嚢胞線維症には、より高用量が必要であろう。

心筋梗塞及び心発作などの虚血—再灌流疾患の治療には、脱2—O—硫酸化ヘパリンを持続的注入により静脈内注射（IV）する。脱2—O—硫酸化ヘパリン 0.5mg/kg を静脈内にボラス投与した後、 $2.5\sim 5.0\text{mg/kg}$ を5%デキストロース $250\sim 500\text{ml}$ 、 $0.45\%\text{NaCl}$ 又は $0.9\%\text{NaCl}$ と混合し、24時間

かけて持続的に注入し、血管系内の血中薬物濃度を一定に保持する。

付加する請求の範囲には、各種の新規かつ有用な本発明の特徴を記載する。

【図1】

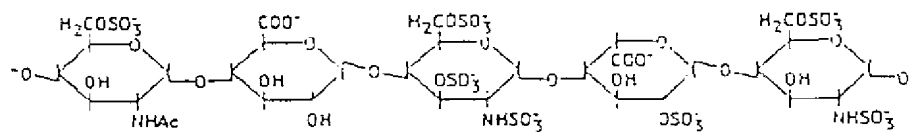


Fig. 1

【図3】

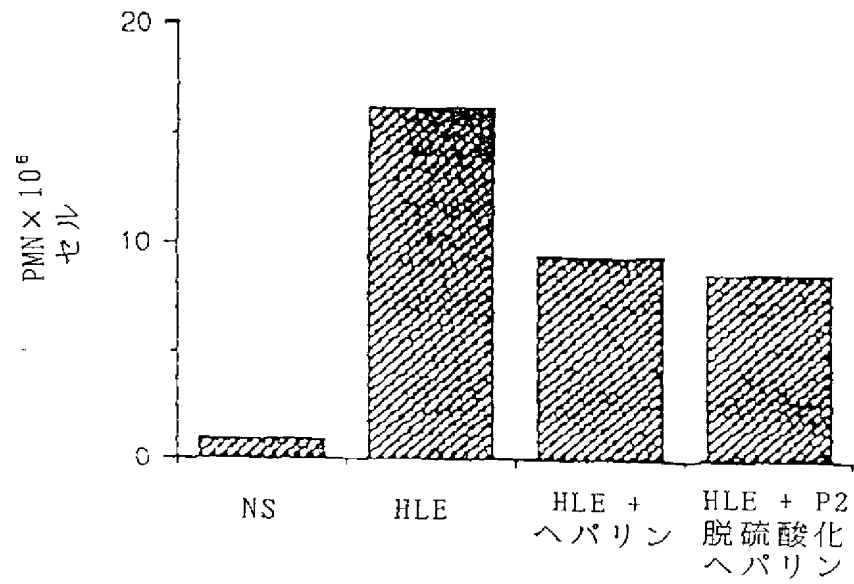


Fig. 3

【図 2】

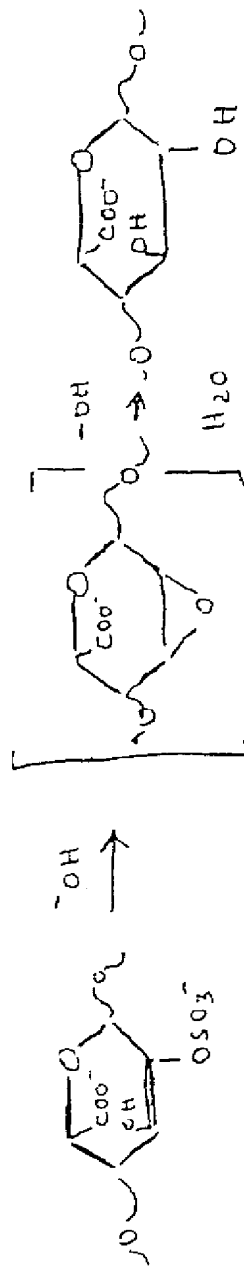


Fig. 2

【図4】

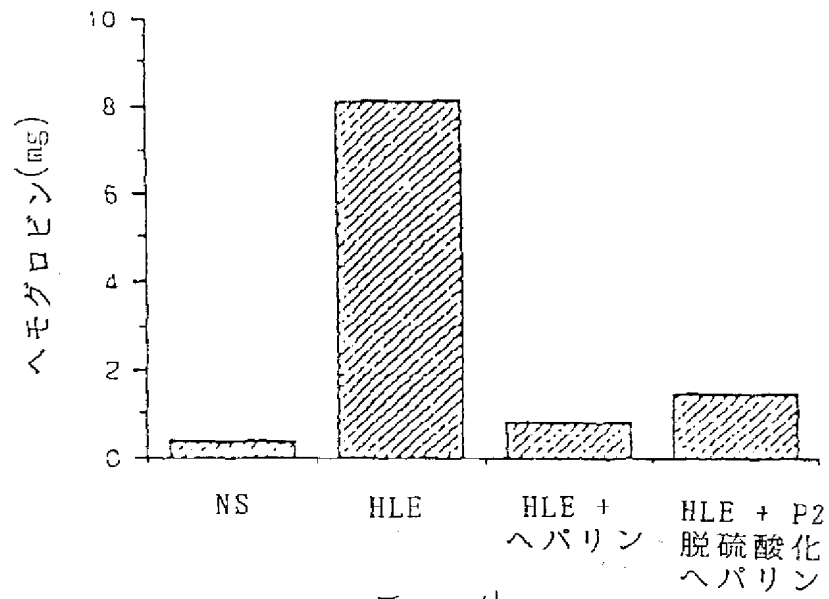


Fig. 4

【図5】

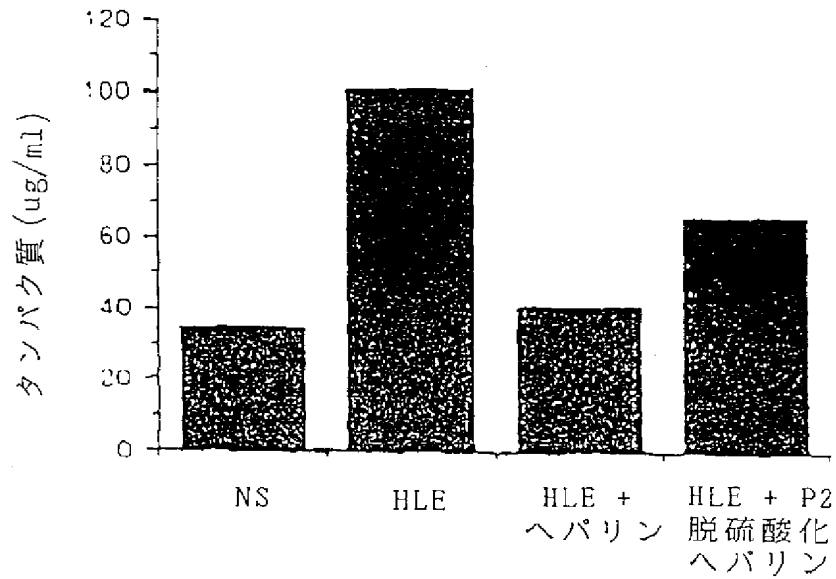


Fig. 5

【手続補正書】特許法第 184 条の 8

【提出日】1994 年 7 月 20 日

【補正内容】

請求の範囲

1. 哺乳類における好中球エラスターゼ及びカテプシン G を阻害するために使用される薬剤の製造のための、ヘパリンの α -L-イズロン酸-2-スルフェート糖単位の 2-O-硫酸基をアルカリ加水分解により除去することによって得ることができる非抗凝固性脱硫酸化ヘパリンの使用。
2. 薬剤をエアロゾル投与されるようにした請求の範囲第 1 項の使用。
3. 薬剤を静脈内注射により投与されるようにした請求の範囲第 1 項の使用。
4. 薬剤が、生理学的に緩衝された食塩水、正常食塩水及び蒸留水から選ばれる担体を含む先行するいずれかの請求の範囲の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 93/06933

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 A61K31/725

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	EP,A,0 557 887 (OPOCRIN S.P.A.) 1 September 1993 see page 2, line 19 - line 30 see page 4, line 7 - line 8 see claims 1,9 ---	1-14
X	BIOCHEMISTRY vol. 25, no. 18, 1986 pages 5322 - 28 'Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase of metastatic melanoma cells' see abstract see page 5327; table I see page 5327, left column, line 7 - line 15 --- -/--	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 March 1994

Date of mailing of the international search report

13. 04. 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gerli, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 93/06933

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>AM.REV.RESP.DIS. vol. 142 , 1990 pages 407 - 12 'Sulfated polysaccharides prevent human leukocyte elastase-induced acute lung injury and emphysema in hamsters' cited in the application see page 409 see page 411, right column, line 8 - line 26</p> <p>---</p>	1-14
A	<p>BIOCHEM.J. vol. 252 , 1988 pages 515 - 19 'Inhibition of leukocyte elastase by heparin and its derivatives'</p> <p>---</p>	1-14
A	<p>EP,A,0 208 623 (SANOFI) 14 January 1987 see page 12, line 19 - line 22 see page 9, line 24 - line 27</p> <p>-----</p>	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 93/06933

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
REMARK: Although claims 8-14 are directed to a method of treatment of (diagnostic method practised on) the human/animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat'l Application No
PCT/US 93/06933

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0557887	01-09-93	NONE	
EP-A-0208623	14-01-87	FR-A- 2584606 JP-A- 62018401	16-01-87 27-01-87